

荘司長三

名古屋大学大学院理学研究科
准教授

生体触媒の誤作動状態を利用するメタンの直接的メタノール変換

§ 1. 研究実施体制

(1)「荘司」グループ(研究機関別)

- ① 研究代表者: 荘司長三 (名古屋大学大学院理学研究科, 准教授)
- ② 研究項目
 - ・シトクロム P450BM3 変異体によるメタン水酸化と新規疑似基質の開発
 - ・シトクロム P450 のヘム置換法の開発
 - ・過酸化水素を利用可能なシトクロム P450 への変換法の開発

(2)「杉本」グループ(研究機関別)

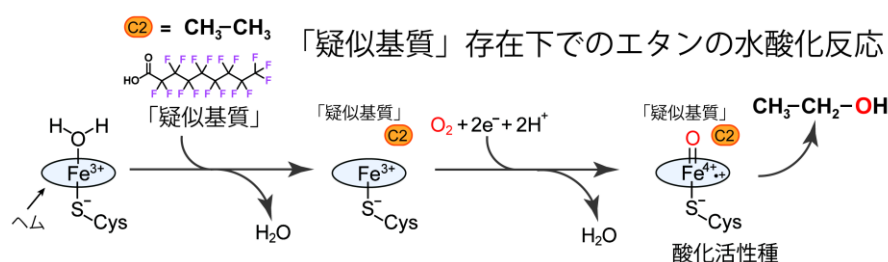
- ① 主たる共同研究者: 杉本宏 (理化学研究所 放射光科学総合研究センター, 専任研究員)
- ② 研究項目
 - ・キセノンを利用するメタンと蛋白質-デコイ分子複合体の相互解析
 - ・シトクロム P450BM3 の動的構造解析に向けた基盤技術開発

§ 2. 研究実施の概要

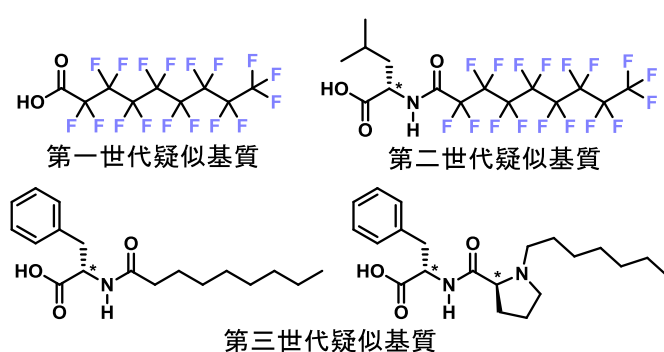
ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体の一種を活性中心に有する酸化酵素のシトクロム P450 (P450) は、常温・常圧の温和な条件下で不活性な有機基質の水酸化反応を触媒することができる強力な酸化酵素であるが、酸化活性の高い細菌由来の P450 の基質選択性は高く、それらが対象とする基質以外の基質との反応効率は非常に低い。細菌由来の P450 をバイオ触媒として利用するためには、高い基質特異性を変換する必要がある。本研究では、メタンやエタンなどの小分子アルカン類の水酸化反応を温和な条件下で触媒する強力な人工金属酵素を開発することを研究目的として、P450 の基質特異性の変換と反応活性向上のための活性中心の合成金属錯体による置換手法の開発に取り組んだ。

(1)シトクロム P450BM3による非対象基質の水酸化と新規デコイ分子の開発:長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分を水酸化する P450BM3 では、長鎖脂肪酸の取り込みが反応を開始する引き金になっていて、長鎖脂肪酸が取り込まれた場合にのみ酸化活性種を生成するようになっている。パーフルオロアルキルカルボン酸を疑似基質(デコイ分子)として取り込ませるとエタンやプロパンなどのガス状アル

カンなどの長鎖脂肪酸とは構造が大きく異なる小分子アルカン類を水酸化できることを明らかにした



(右図). また、パーフルオロアルキルカルボン酸のカルボキシル基をアミノ酸で修飾した第二世代のデコイ分子では活性が大幅に向上することを明らかにしてきた。本年度の研究では、第二世代デコイ分子をさらに発展させた第三世代のデコイ分子を開発し、長鎖脂肪酸とは大きく構造が異なる



カルボン酸であっても、カルボキシル基をアミノ酸で修飾することで、高効率な反応を行うことができるデコイ分子(左図)となることを明らかにした。さらに、デコイ分子の構造の違いが酸化活性だけでなく、生成物の位置・立体選択性に大きく影響を及ぼすことも明らかにした。

(2)過酸化水素駆動型シトクロム P450 への変換法とヘム置換法の開発:長鎖脂肪酸水酸化酵素の P450SPa は過酸化水素を利用することができるが、長鎖脂肪酸以外の基質に対する活性は著しく低い。P450SPa の活性部位に、変異導入によってグルタミン酸を配置して長鎖脂肪酸が結合した状態を疑似的に再現すると、長鎖脂肪酸以外の基質を水酸化できることを明らかにした。^[3] 酸素分子を活性化する一般的な P450 の P450BM3 や P450cam を僅か一残基のアミノ酸置換により過酸化水素駆動型に変換できることも明らかにした。さらに、過酸化水素駆動型 P450 のヘムを合成金属錯体に置換する手法を合わせて開発した。^[2]

(3)キセノンメタンアナログとする結晶構造解析:酵素への基質アクセス経路の解析を行うために、デコイ結合型 P450BM3 変異体の結晶に、メタンアナログとしてキセノンガスを高圧下で導入して結晶構造解析を行い、3 つのキセノン結合部位が存在することを明らかにした。これらの構造情報をメタン水酸化のための P450BM3 変異体の設計にフィードバックし、酸化活性の強化を図る。